

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro

**INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)**

<p>(51) Internationale Patentklassifikation 5 : C12N 15/13, C12P 21/08 C12Q 1/68, C07K 15/28 G01N 33/53</p>	<p>A1</p>	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 93/01288</p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 21. Januar 1993 (21.01.93)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP92/01524</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 6. Juli 1992 (06.07.92)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: P 41 22 599.6 8. Juli 1991 (08.07.91) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS [DE/DE]; Im Neuenheimer Feld 280, D-6900 Heidelberg (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US) : BREITLING, Frank [DE/DE]; Am Schloßberg 49, D-6900 Heidelberg (DE). LITTLE, Melvyn [GB/DE]; Fritz-von Briesen-Str. 10, D-6903 Neckargemünd-Dilsberg (DE). DÜBELS, Stefan [DE/DE]; Quinckestr. 24, D-6900 Heidelberg (DE). BRAUNAGEL, Michael [DE/DE]; C 2, 1, D-6800 Mannheim 1 (DE). KLEWINGHAUS, Iris [DE/DE]; Richard-Wagner-Str. 30, D-6800 Mannheim (DE).</p>		
<p>(74) Anwalt: MÜLLER-BORE & PARTNER; P.O. Box 26 02 47, D-8000 München 26 (DE).</p> <p>(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IT, LU, MC, NL, SE).</p> <p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i></p>		
<p>(54) Title: PHAGEMIDE FOR SCREENING ANTIBODIES</p> <p>(54) Bezeichnung: PHAGEMID ZUM SCREENEN VON ANTIKÖRPERN</p>		
<p>(57) Abstract</p> <p>A phagemide has been constructed that expresses an antibody merged to coliphage pIII protein. The phagemide is suitable for selecting specific antibodies from large gene banks with small quantities of antigen. The antibody-pIII gene can be strongly repressed, so that it allows antibody banks to be amplified without the danger of deletion mutants predominating. After induction, large quantities of the merged protein may be expressed.</p>		
<p>(57) Zusammenfassung</p> <p>Ein Phagemid wurde konstruiert, das einen an Coliphagen pIII Protein fusionierten Antikörper exprimiert. Das Phagemid eignet sich zur Selektion von spezifischen Antikörpern aus großen Genbanken unter Verwendung kleiner Mengen Antigen. Das Antikörper-pIII-Gen kann stark reprimiert werden, so daß Antikörper-Banken ohne Gefahr einer Dominanz von Deletionsmutanten amplifiziert werden können. Nach Induktion können große Mengen des fusionierten Proteins exprimiert werden.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	FI	Finnland	MN	Mongolei
AU	Australien	FR	Frankreich	MR	Mauritanien
BB	Barbados	GA	Gabon	MW	Malawi
BE	Belgien	GB	Vereinigtes Königreich	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GN	Guinea	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	GR	Griechenland	PL	Polen
BJ	Benin	HU	Ungarn	RO	Rumänien
BR	Brasilien	IE	Irland	RU	Russische Föderation
CA	Kanada	IT	Italien	SD	Sudan
CF	Zentrale Afrikanische Republik	JP	Japan	SE	Schweden
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SN	Senegal
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SU	Soviet Union
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	TD	Tschad
CM	Kamerun	LK	Sri Lanka	TG	Togo
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	US	Vereinigte Staaten von Amerika
DE*	Deutschland	MC	Monaco		
DK	Dänemark	MG	Madagaskar		
ES	Spanien	ML	Mali		

1

5

Phagemid zum Screenen von Antikörpern

10 Die vorliegende Erfindung betrifft Phagemide zur Selektion
von spezifischen, aus großen Genbanken erhaltenen
Antikörpern, die Herstellung dieser Phagemide und ihre
Verwendung zur Selektion von spezifischen, aus großen
Genbanken erhaltenen Antikörpern unter Verwendung geringer
15 Mengen von Antigen.

Plasmid- und Phagen-Antikörper-Genbanken wurden in E.coli
von PCR-amplifizierten Immunglobulin-Familien nach
Immunisierung entwickelt. Rekombinante Antikörper gegen
20 Immunogene wurden durch ELISA-Tests der Bakterienüberstände
von isolierten Bakterienkolonien (Ward, E.S., Güssow, D.,
Griffiths, A.D., Jones, P.T. and Winter, G., "Binding
activities of a repertoire of single immunoglobulin variable
domains secreted from Escherichia coli", Nature (1989), 341,
25 544-546) oder durch Screenen von auf Nitrocellulose
übertragenen Plaques von Bakterienkolonien auf Reaktivität
gegen radioaktiv markierte Immunogene (Huse, W.D., Sastry,
L., Iverson, S.A., Kang, A.S., Alting-Mees, M., Burton,
D.R., Benkovic, S.J. and Lerner, R.A., "Generation of a
30 large combinatorial library of the immunoglobulin repertoire
in phage lambda," Science (1989), 246, 1275-1281)
selektiert. Zur Selektion jedoch von spezifischen
Antikörpern von Genbanken willkürlich kombinierter leichter
und schwerer Ketten von nicht-immunisierten Tieren, bei
35 denen kein Übergewicht von Antikörpern für ein bestimmtes

-2-

1

Antigen vorliegt, ist ein Verfahren zum Screenen von Millionen von Antikörper-produzierenden Bakterien notwendig.

5

Ein möglicher Weg, einen großen Bereich von Antikörpern zu screenen, liegt darin, rekombinante Antikörper an die Oberfläche von Bakterien oder Bakteriophagen zu binden, sodaß sie dann rasch durch an eine feste Phase gebundene Antigene selektiert werden können. Hinsichtlich der Schwierigkeiten, Proteine gezielt auf die Zelloberfläche von Bakterien zu bringen, ist die M13-Familie von filamentösen Bakteriophagen wegen ihrer kleinen Größe und ihres relativ einfachen genetischen Aufbaus ein verlockender Kandidat (vgl. Übersichtsartikel von Webster, R.E. and Lopez, J., in "Virus Structure and Assembly", herausgegeben von S. Casjens, veröffentlicht von Jones and Bartlett Inc., Bosten/Portala Valley, USA, 1985; Day, L.A., Marzec, C.J., Reisberg, S.A. and Casadevall, A., "DNA packaging in filamentous bacteriophages", Ann. Rev. Biophys. Chem. (1988), 17, 509-539).

15

20

25

30

35

Das Produkt von Gen III (pIII) ist ein relativ flexibles und zugängliches Molekül, das aus zwei funktionellen Domänen zusammengesetzt ist; einer amino-terminalen Domäne, die an den F-Pili männlicher Bakterien während der Infektion bindet, und einer carboxy-terminalen, innerhalb des Virion verborgenen Domäne, die für die Morphogenese wichtig ist. Peptide können zwischen den zwei Domänen von pIII (Smith, G.P., "Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface", Science (1985), 228, 1315-1317) oder in der Nähe des N-Terminus (Parmley, S.F. and Smith, G.P., "Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes", Gene (1988), 73, 305-318) ohne Zerstörung seiner Funktionen in Morphogenese und Infektion inseriert

-3-

1

werden. Nach erheblicher Pionierarbeit über die Verwendung von pIII in fd Phagen zum Führen fremder Peptide, zeigten Parmely and Smith (1988, vorstehend angegeben), daß
5 Peptidepitope, die am amino-terminalen Ende inseriert sind, Phagen an immobilisierte Antikörper binden können. In Folge dieser Arbeit war es möglich, Peptid-Genbanken zu entwickeln, die man auf Bindung an Liganden und Antikörpern screenen kann (Scott, J.K. and Smith, G.P. "Searching for
10 peptide ligands with an epitope library", Science (1990), 249, 386-390; Devlin, J.J., Panganiban, L.C. and Devlin, P.E., "Random peptide libraries: A source of specific protein binding molecules", Science (1990), 249, 404-406; Cwirla, S.E., Peters, E.A., Barrett, R.W. and Dower, W.J.,
15 "Peptides on phage, a vast library of peptides for identifying ligands", Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1990), 87, 6378-6382).

McCafferty, J., Griffith, A.D., Winter, G. and Chiswell, D.J., "Phage antibodies: filamentous phage displaying
20 antibody variable domains", Nature (1990), 348, 552-554 berichteten über den Zusammenbau eines Antikörper-pIII-Fusionsproteins in einen fd-Phagen mit einem Tet^R-Gen nach Insertion der Antikörper-DNA in das 5'-Ende von Gen III. Der
25 Phage blieb infektiös und konnte durch Affinitäts-Chromatographie angereichert werden. Die Fusionsphagen zeigten sich jedoch hauptsächlich für relativ kleine Inserts als geeignet, wahrscheinlich weil die großen Inserts einen negativen Einfluß auf die Infektivität von pIII haben
30 (Parmlee and Smith, 1988, vorstehend angegeben). Daher besteht ein großes Risiko, daß in Phagen-Genbanken nach ihrer Amplifikation schnell Deletionsmutanten dominieren.

Der vorliegenden Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde,
35 ein wirksameres Mittel zum Screenen von Antikörper-Genbanken

1

in Bakterien bereitzustellen.

5

Erfindungsgemäß wird dies durch ein Phagemid nach Anspruch 1 erreicht, das ein funktionelles Antikörper-pIII-Fusionsprotein exprimiert. Vorzugsweise ist der Antikörper ein Einzelketten-Antikörper.

10

15

20

25

DNA, die für ein Antikörper-pIII-Fusionsprotein, vorzugsweise ein Einzelketten-Antikörper-pIII-Fusionsprotein, codiert, wurde in ein Phagemid eingebaut. Ein großer Vorteil des erfindungsgemäßen Phagemid-Systems gegenüber McCafferty et al. (vorstehend angegeben) liegt darin, daß es als Plasmid vermehrt werden kann und nicht unter Selektionsdruck bezüglich der Entfernung von Antikörper-DNA steht, da die Expression des Fusionsproteins stark unterdrückt ist. Dies ist insbesondere während der Amplifikation der Antikörper-Genbanken wichtig, wenn schneller proliferierende Deletionsmutanten rasch dominant werden könnten. Die Phagemid DNA, die weniger als die Hälfte obiger Phagen DNA ausmacht, transformiert auch Bakterien effizienter. Darüberhinaus werden im Gegensatz zu obigem Phagensystem große Mengen der kleineren Phagemid DNA produziert und große Mengen von Antikörperprotein sind nach Induktion verfügbar, wodurch die Analyse stark erleichtert wird.

30

35

Die Expression des Antikörper-pIII-Fusionsproteins, insbesondere des Einzelketten-Antikörper-pIII-Fusionsproteins, unter Verwendung des pSEX-Phagemids und seiner Verpackung in virale Partikel erleichtert die Entwicklung bakterieller Systeme zur Isolierung von Antikörpern hoher Affinität. Millionen Antikörper-produzierende Klone von Antikörper-Genbanken kann man jetzt rasch durch Bindung an immobilisierte Antigene screenen. Ein weiterer Vorteil gegenüber herkömmlichen Verfahren zum Screenen liegt darin, daß nur kleine Mengen Antigen benötigt werden, ein

-5-

1 wichtiger Faktor, wenn der Vorrat eines seltenen Proteins
begrenzt ist. Dieses System ermöglicht auch, zufällig
mutierte Antikörper zu screenen, um ihre Bindungs-
Affinitäten zu erhöhen. Das Verfahren kann mehrfach
5 wiederholt werden, bis die gewünschte Spezifität erreicht
ist. Es ist nun zum ersten Mal möglich, in großem Maßstab
unterschiedliche Tests zum Screenen von verwandten Zellen
und Organismen durchzuführen. Eine subtraktive Selektion,
beispielsweise unter Verwendung von normalen und
10 neoplastischen Zellen, kann zur Identifizierung von
Tumor-assoziierten Antigenen verwendet werden. Das
Phagemid-System erweist sich auch als äußerst hilfreich für
die Untersuchung molekularer Wechselwirkungen,
beispielsweise durch Selektion von Antikörpern, die eine
15 Liganden-Rezeptor-Bindung verhindern.

Ebenso erweist sich das erfindungsgemäße System als nützlich,
andere Proteine oder Peptide an den Oberflächen von
Phagemid-Viruspartikeln zu präsentieren. Hierfür ist die
20 Antikörper-DNA nur durch die DNA des gewünschten Polypeptids
zu ersetzen.

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung.

25 Beispiel 1

Konstruktion eines Phagemids (pSEX)

30 DNAs, die für einen Einzelketten-Antikörper (scAb) und pIII
codieren, wurden nach Insertion eines spezifischen Satzes
von Restriktionsstellen und einer Protease-sensitiven
Verbindungssequenz in die multiple Klonierungsstelle in pUC
119 kloniert. Die Ab-DNA codierte für die variablen Domänen
der schweren und leichten Kette eines humanisierten Ab gegen
35 Hühnereiweiß-Lysozym, der von dem Anti-Lysozym Ab D1.3
stammte (Amit et al., Science (1986), 233, 747-754;
Verhoeyen, M. et al., Science (1988), 239, 1534-1536). Diese
Domänen wurden über eine 18-Aminosäure-Linker-Sequenz

-6-

1 verbunden, die das Epitop des monoklonalen Ab YOL1/34
enthielt (Breitling, F. and Little, M., "Carboxy-terminal
regions on the surface of tubulin and microtubules: Epitope
locations of YOL1/34, DM1A and DM1B", J. Mol. Biol. (1986),
5 189, 367-370), wodurch der Ab identifiziert werden konnte.
Zur Bereitstellung einer flexibleren Verbindung zu pIII,
wurde das 3'-Ende der DNA für die leichte Kette durch Zusatz
von Nucleotiden, die für die ersten sechs Aminosäuren der
konstanten Domäne in der menschlichen Kappa-Kette codierten,
10 gefolgt von einer BamHI-Restrictionsstelle modifiziert. pIII
DNA wurde von dem Bakteriophagen M13 amplifiziert, indem
Primer entsprechend der 5'- und 3'-Enden des Gens III
verwendet wurden. Die Ab-pIII-DNA wurde dann in einem
Phagemid der pDS-Familie kloniert, das einen mit zwei
15 lac-Operatoren kombinierten Coliphagen-T7-Promotor enthielt
(Bujard, H., Gentz, R., Lancer, M., Stüber, D., Müller,
H.-M., Ibrahim, I., Häuptle, M.-T. and Dobberstein, B.,
"A T5 promoter-based transcription-translation system for
the analysis of proteins in vitro and in vivo", Methods
20 Enzymol. (1987), 155, 416-433; Lancer, M. and Bujard, H.,
"Promoters determine the efficiency of repressor action",
Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1988), 85, 8973-8977; Müller,
H.-M., Ph. D. thesis, Univ. Heidelberg, 1989). Schließlich
wurde eine für die Leader-Sequenz des bakteriellen Enzyms
25 Pektatlyase codierende DNA an das 5'-Ende der Ab-DNA
ligiert, wodurch das Phagemid pSEX (Fig. 1a) erhalten wurde.
Die Leader-, Linker- und PCR-Primer-Sequenzen sind in Figur
1b gezeigt. Eine alternative Linker-Sequenz (Fig. 1c) mit
dem YOL1/34 Epitop am Ende des Linkers, die eine nützliche
30 Restriktionsstelle zur Insertion von Ab-Genbanken enthielt,
wurde auch verwendet. Obwohl beide tag-Linker eine
bedeutsame Menge saurer Reste enthielten, zeigten sie sich
ohne Effekt auf die Herstellung von funktionellen scAbs im
Vergleich mit scAbs, deren Linker nur aus den neutralen
35 Aminosäuren Glycin und Serin zusammengesetzt waren.

-7-

1

Beispiel 2

5

Expression eines Antikörper-pIII-Fusionsproteins

10

15

20

25

30

35

Zur Überprüfung, ob der fertige Phagemid-Vektor in der Lage war, das Fusionsprotein in voller Länge zu exprimieren, wurden 100 μ m IPTG einer sich in log-Phase befindlichen, mit pSEX transformierten E. coli-Kultur zugegeben. Die Kultur zeigte einen deutlichen Rückgang in ihrer Wachstumsrate, verglichen mit der Kontrolle, was auf eine bedeutsame Synthese eines Phagemid-codierten Proteins hinwies. In der Western-Blot-Analyse wurde das Antikörper-pIII-Konstrukt durch drei Antikörper identifiziert; einem monoklonalen Antikörper gegen einen Teil der Linker-Sequenz (EEGEFSEAR) und zwei Anti-Peptid-Kaninchenseren gegen N-terminale Sequenzen der schweren und leichten Ketten (QVQLQQSGGG bzw. DJQMTQSPSS). Es wanderte mit einem offensichtlichen Molekulargewicht von 93 kD (Fig. 2). Die große Größe des Fusionsproteins (vorausgesagt: Mr 68.100) ist höchstwahrscheinlich durch die pIII-Komponente (Mr 42.100) bedingt, die mit einem offensichtlichen Molekulargewicht von etwa 55.000 - 70.000 kD wandert (Goldsmith, M.E. and Königsberg, W.H., "Adsorption protein of the bacteriophage fd: isolation, molecular properties and location in the virus", Biochemistry (1977), 16, 2868-2694). Partielle Proteolyse des Fusionsprotein wurde durch das Vorliegen einiger schwächerer Banden niedrigeren Molekulargewichts angezeigt, die mit den drei Antikörpern identisch angefärbt wurden.

Eine Zellfraktionierung zeigte, daß das Protein in den Cytoplasma und Membran-Fraktionen vorlag, nicht aber im Periplasma und dem Kulturüberstand (Fig. 2, Spuren 3-6) im Gegensatz zu der Antikörper-Komponente allein ohne pIII, die in das

-8-

1

Periplasma und das Medium sekretiert wurde (Daten nicht
gezeigt). Dies war nicht überraschend, da pIII auf
Phagenpartikeln aus der inneren bakteriellen Membran
zusammengesetzt wird, ein Prozeß, der scheinbar nur von der
C-terminalen Domäne abhängt. Deletionsmutanten von pIII ohne
diese Domäne gelangen in das Periplasma, ohne an die
cytoplasmatische Membran gebunden zu werden (Boeke, J.D. and
Model, P., "A prokaryotic membrane anchor sequence: carboxyl
terminus of bacteriophage fl gene III protein retained in
the membrane", Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1982), 79,
5200-5204), und normale Phagenpartikel werden nicht
zusammengesetzt (Crissman, J.W. and Smith, G.P., "Gene III
protein of filamentous phages: evidence for a
carboxy-terminal domain with a role in morphogenesis",
Virology (1984), 132, 445-455). Die Anker-Sequenz ist
wahrscheinlich eine hydrophobe Strecke von 23 Aminosäuren am
Carboxy-Terminus (Davis, N.G., Boeke, S. and Model, P.,
"Fine structure of a membrane anchor domain", J. Mol. Biol.
(1985), 181, 111-121).

Die Fähigkeit des Fusionsproteins, ein Antigen zu binden,
wurde untersucht, indem die Triton-lösliche Fraktion über
eine an Sepharose gebundene Lysozymsäule gegeben wurde.
Western Blots des ungebundenen Materials und der nach
gründlichem Waschen und Eluieren mit 0,05 M Dimethylamin
erhaltenen Fraktionen zeigten, daß das Fusionsprotein in
voller Länge tatsächlich spezifisch auf der Lysozymsäule
zurückgehalten wurde (Fig. 2, Spuren 7-12).

30

Beispiel 3

Verpackung des pSEX-Phagemids

35

Zur Bestimmung, ob der Phagemid-Expressionsvektor verpackt
werden konnte, wurden pSEX-enthaltende E.coli mehrfach mit

1

dem Phagen fd infiziert. IPTG wurde nicht zugegeben, da gefunden wurde, daß es einen inhibitorischen Effekt auf das Verpacken eines Phagemids hat. Ähnliches wurde kürzlich von Bass et al., Proteins (1990), 8, 309-314 berichtet, der ein Phagemid konstruierte, das ein Fusionsprotein aus humanem Wachstumshormon und der C-terminalen Domäne von pIII exprimierte. Die Untersuchung der Ab-pIII-Produktion mit und ohne IPTG nach Zugabe des Phagen fd zeigte, daß der Phage allein in der Lage war, eine Expression zu induzieren (Fig 3). Eine mögliche Erklärung hierfür ist, daß eines der Phagen-Gen-Produkte die Bindung des lac-Repressors an den Operator stört. Andererseits könnte die Bindung von Phagen-Proteinen an die Zwischengenregion die Topologie des Phagemid beeinflussen und die Freisetzung des lac-Repressors bewirken. Wie auch immer, wir haben gefunden, daß das Durchwandern der Zwischengenregion 10^3 Nukleotide zu der anderen Seite des bla-Gens keinen Effekt auf dieses Phänomen hat (Daten nicht gezeigt).

20

Agarose-Gelelektrophorese der von Viruspartikeln in das Medium abgegebenen DNA zeigt zusätzlich zu der Einzelstrang-DNA von fd eine größere Menge kleinerer DNA, die in der Größe mit einzelsträngigem pSEX vergleichbar war. Ein weiterer Beweis für eine Phagemid-Verpackung und der Produktion von infektiösen Partikeln wurde durch Infektion von E.coli mit den abgegebenen Virus-Partikeln erbracht. 10^{10} ml Amp^R E.coli Kolonien wurden im Vergleich zu 3×10^9 pfu erhalten.

30

Zur Bestimmung, ob das verpackte Phagemid das Antikörper-pIII-Fusionsprotein eingebaut hatte, wurden 90 µl Kulturüberstand, der 5×10^8 verpackte, als Amp^R transduzierende Einheiten bestimmte Phagemide enthielt, mit einem tausend-fachen Überschuß an Wildtyp fd-Phage gemischt,

35

-10-

1

und über eine Säule immobilisierten Lysozyms gegeben. Nach gründlichem Waschen mit 10-fachem Badvolumen von PBS, 1 M NaCl bzw. 0,5 M NaCl in 0,1 M NaHCO₃ bei pH 8,3 wurden die Phagemid-Partikel mit 0,05 M Diethylamin eluiert. Das Eluat wurde mit 0,5 M NaH₂PO₄ neutralisiert und auf die Anzahl der Phagen und verpackten Phagemide getestet (Tabelle). Eine spezifische Anreicherung von bis zu 121-fach wurde erreicht, was den Einbau von funktionellen Antikörper-pIII-Konstrukten in die Phagemid-Partikel zeigte. Die Bindungseigenschaften der Phagemid-Partikel können weiter erhöht werden, indem eine pIII Deletionsmutante zum Verpacken verwendet wird. Dies garantiert, daß nur jene Phagemide, die für funktionelle Fusionsproteine codieren, verpackt werden und alle fünf pIII-Proteine auf einem Phagemid-Partikel mit Antikörper fusioniert werden.

10

15

Beschreibung der Figuren

20

Figur 1: Konstruktion von pSEX, einem Phagemid zum Screenen von Antikörpern

VH und VL sind variable Domänen der schweren bzw. leichten Kette eines Anti-Lysozym-Ab.

25

(a) Konstruktion

Zur Bereitstellung der notwendigen Restriktionsstellen, wurden die Oligonukleotide

5'-GCTGAATTCGGATCCATAGGGCCCTCTAGAGTCGAC3' und

30

5'-AATTGTCGACTCTAGAGGGCCCTATGGATCCGAATTCAGCTGCA3'

5'-phosphoryliert, miteinander hybridisiert und in pUC119 ligiert, der mit PstI und EcoRI geschnitten und dephosphoryliert war. Gegebenenfalls wurden zur

35

-11-

1 Schaffung einer Protease-sensitiven Sequenz die
hybridisierten Oligonucleotide 5'GATCCAAAGATATCAGAGGGCC3'
und 5'CTCTGATATCTTTG3' zwischen die BamHI- und ApaI-Stellen
5 des ersten Oligonucleotid-Satzes inseriert. scAB-DNA wurde
dann zwischen die PstI- und BamHI-Stellen inseriert, gefolgt
von der Ligierung der pIII-DNA über stumpfe Enden nach
Spaltung des Phagemids mit ApaI und Behandlung mit
T4-DNA-Polymerase zur Entfernung 3'-überhängender Enden.
10 pSEX wurde hergestellt, indem die multiple Klonierungsstelle
von pUHE 24-2 mit dem nahe verwandten Phagemid pDS31-1
kombiniert wurde, das eine zusätzliche fl Zwischengenregion
enthielt (Bujard et al., 1987, vorstehend angegeben; Müller,
1989, vorstehend angegeben). die pDS31-1-Sequenz erstreckt
15 sich von XhoI entgegen des Uhrzeigersinns bis zu einer
HindIII-Stelle (in Klammern), die nach Ligierung über
stumpfe Enden verloren wurde. pUHE24-2 ist im wesentlichen
mit pDSG identisch (Bujard et al., 1987), bei dem ein
Choli-Phage T7-Promotor mit zwei lac-Operatoren und einer
20 Ribosomen-Bindungsstelle kombiniert ist (PA1/04/03, Lancer
and Bujard, 1988, vorstehend angegeben; Lanzer, 1988,
vorstehend angegeben). Das erhaltene Phagemid wurde mit
HindIII geschnitten und die 5'-überhängenden Enden wurden
mit Klenow-Fragment aufgefüllt. Nach einer weiteren Spaltung
25 mit PstI, wurde das PstI-HincII Ab-pIII-DNA-Fragment in das
Phagemid inseriert. Schließlich wurde eine synthetische DNA,
die für die Leader-Sequenz des Bakterienenzym Pektatlyase
und für die ersten vier Aminosäuren der schweren Kette
codiert, zwischen die NcoI und PstI-Restriktionsstellen
30 inseriert. pUHE-Plasmide wurden in E.coli 71-18 mit dem
Plasmid pDM1, das den lac-Repressor exprimiert, vermehrt,
pUC-Plasmide wurden in DH5 vermehrt und das
Antikörper-pIII-Fusionsprotein in JM101 exprimiert.

35

-12-

1

(b) Sequenz der Ribosomenbindungsstelle (RBS), der Leader-Sequenz der Pektatlyase, des tag-Linkers und der PCR-Primer für pIII.

5

Unterstrichene Aminosäuren geben das Epitop für YOL1/34 an. Die folgenden Aminosäuren in der Linker-Sequenz sind eine Fortführung der -Tubulin-Sequenz.

10

(c) Mögliche tag-Linker-Sequenz. Unterstrichene Aminosäuren geben das Epitop für YOL11/34 an. Die Aminosäuren des vorhergehenden Linkers sind eine Fortführung der Ab-Sequenz in die konstante Domäne.

15

Fig. 2: Induzierbarkeit, zelluläre Lokalisierung und Antigenbindung des Antikörper-pIII-Fusionsproteins, analysiert durch Gelelektrophorese auf 8 % Polyacrylamidgelen und Western Blott.

20

Spuren 1 und 2: Gesamte Zellen nach 1 h Inkubation mit 100 μ M IPTG (1) oder ohne IPTG (2).

Spuren 3 - 6: Zellfraktionierung; 3: Kulturüberstand, 4: periplasmatisch angereicherte Fraktion, 5: lösliche cytoplasmatische Fraktionierung, 6: 1 % Tritonextrakt.

25

Spuren 7 - 12: Lysozym-Affinitätschromatographie des 1 % Tritonextraktes von induzierten und nicht-induzierten Zellen, 7: Ausfluß (+IPTG), 8: Ausfluß (-IPTG), 9: letzte Waschung (+IPTG), 10: letzte Waschung (-IPTG), 11: Eluat (+IPTG), 12: Eluat (-IPTG).

30

Spuren 1 - 6 wurden angefärbt unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers YOL1/34 (Serotec, Oxford, U.K.) und Spuren 7 - 12 unter Verwendung eines Antiserums gegen die N-terminale Sequenz der leichten Kette.

35

-13-

1

Durchführung:

Antiseren gegen die schweren und leichten Ketten wurden durch subkutane Injektion von Kaninchen mit den

5 amino-terminalen Peptiden QVQLQSGGG(AC) bzw. DIQMTQSPSS(AC) erhalten, die an das Heamocyanin der Schlüssellock-Napfschnecke gekoppelt waren. Zur Untersuchung der Expression des Fusionsproteins wurden pelletierte Bakterien von IPTG-induzierten Kulturen in 30 mM Tris/HCl, pH 8,0

10 Puffer resuspendiert, der 20 % Sucrose, 1 mM EDTA, 1 mg/ml Hühnerlysozym enthielt, und 10 min auf Eis inkubiert. Nach 1 minütiger Zentrifugation bei 15 000 g wurde der die periplasmatischen Proteine enthaltende Überstand gesammelt und das Pellet in 0,1 M Tris/HCl, pH 8,0 beschallt. Die

15 lösliche cytosolische Fraktion wurde nach 5 minütiger Zentrifugation bei 15 000 g abdekantiert und das resuspendierte Pellet in 1 % Triton X100 inkubiert, wodurch die membrangebundene Fraktion erhalten wurde. Sämtliche Fraktionen wurden auf β -Lactamase-Aktivität gemäß Plückthun, A. und Knowles, J.R.: "The consequences of stepwise

20 deletions from the signal-processing site for β -lactamase", J.Biol. Chem. 262 (1987), 3951-3957 getestet, um die Effizienz des Fraktionierungsschrittes zu erfahren. Die tritonlösliche Fraktion wurde mit PBS 100-fach verdünnt, bevor sie Affinitätssäulen zugegeben wurde. Zur

25 Affinitäts-Chromatographie wurde Hühnerlysozym (Boehringer, Mannheim, FRG) mit Cyanogenbromid-aktivierter Sepharose (Pharmacia) gemäß den Anweisungen des Herstellers gekoppelt. Die Lysozym-Sepharose wurde 20 min bei Raumtemperatur mit

30 den Extrakten inkubiert und in Säulen gegossen, die nachfolgend mit 10 Bad-Volumina von PBS, 1M NaCl bzw. 0,5 M NaCl in 0,1 M NaHCO_3 bei pH 8,3 gewaschen wurden, bevor sie mit 0,05 M Diethylamin eluiert wurden. Sämtliche Fraktionen wurden mit Trichloressigsäure (Endkonzentration

35 20 %) präzipitiert und in SDS Polyacrylamidgelen aufgetrennt (Laemmli, U.K.: "Cleavage of structural proteins

-14-

1 during the assembly of the head of the bacteriophage T4",
Nature (1970), 227, 680-685). Western Blots wurden gemäß
Towbin, H Steahelin, T. and Gordon, I.: "Electrophoretic
5 transfer of protein from polyacrylamide gels to
nitrocellulose sheets: procedures and some applications",
Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1979), 76, 4350-4354,
durchgeführt, indem zweite Antikörper, die an
Meerrettich-Peroxidase gekoppelt waren, mit Diaminobenziden
10 als Substrat verwendet wurden.

Fig. 3: Gelelektrophorese von zirkulärem einzelsträngigen
pSEX

15 Spur 1: fd, Spur 2: Kontroll-Phagemid pUHE31-1 mit fd,
Spur 3: pSEX1 mit fd.

20 DNA von fd Virionen und verpackte Phagemid-Partikel wurden
auf 0,8 % Agarosegele in 1xTBE gemäß Sambrook, J., Fritsch,
E.F. und Maniatis, T. in "Molecular Cloning: A Laboratory
Manual, "2. Auflage, herausgegeben in Cold Spring Harbor
Laboratory (1989) gegeben und mit Ethidiumbromid angefärbt.

25 Durchführung:
Zur Herstellung verpackter Phagemide wurden pSEX1
enthaltende E. coli JM101 auf M9 Minimalmedium ausplattiert
und 30 h bei 37°C inkubiert. 2 ml des gleichen Mediums
30 wurden mit einer der Kolonien angeimpft und bei 37°C unter
kräftiger Belüftung inkubiert, bis eine optische Dichte von
etwa 0,2 bei 600 nm erreicht wurde. 0,5 ml LB-Medium und ein
10-facher Überschuß des Phagen fd wurden dann der Kultur
zugegeben und diese weitere 3 h bei 37°C inkubiert. Nachdem
35 zweimal vorsichtig bei 15 000 g 5 min lang bei Raumtemperatur

-15-

1

zentrifugiert worden war, wurde der Überstand auf eine
Endkonzentration von 4 % Polyethylenglykol (Serva PEG 6000)
und 0,5 M NaCl eingestellt und über Nacht bei 4°C stehen
5 gelassen. Die Phagemide wurden durch 20 minütige
Zentrifugation bei Raumtemperatur und 15 000 g sedimentiert
und in 200 µl Tris-EDTA-Puffer, pH 7,5 suspendiert.
Phagemid DNA wurde durch zehnminütiges Schütteln mit einem
Volumen Phenol, gefolgt von einer Behandlung mit
10 Chloroform-Isopropanol und Präzipitation mit Isopropanol
präpariert (Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T., in
"Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2. Auflage,
herausgegeben in Cold Spring Harbor Laboratory (1989)).

15

20

25

30

35

TABELLE

Spezifische Anreicherung von verpackten Phagemiden an einer Antigen-Affinitätssäule

Gesamtes Volumen (ml)	Plattiertes Volumen (µl)	Amp ^r Kolonien		Gesamt Volumen (µl)	Plattiertes Volumen (µl)	Gesamt pfu		Gesamt Überschuß pfu/Amp ^r	Anreiche- rungs- faktor
		Zahl				Zahl			
Aufgetragen	10	51	10^{-3}	$5,1 \times 10^8$	10^{-6}	45	$4,5 \times 10^{11}$	882	--
Eluiert	1,1	26	10^{-1}	$2,9 \times 10^5$	10^{-2}	19	$2,1 \times 10^6$	7,3	$\frac{1}{121}$

1

- 17 -

5

Patentansprüche

10

1. Phagemid mit einer für ein Fusionsprotein aus einem Antikörper und einem Coliphagen pIII-Protein codierenden DNA, dadurch gekennzeichnet, daß das Fusionsprotein das Coliphagen pIII-Protein in voller Länge umfaßt.

15

2. Phagemid nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Antikörper ein Einzelketten-Antikörper ist.

20

3. Phagemid nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Fusionsprotein zwischen dem Antikörper und dem Coliphagen pIII-Protein einen Protease-sensitiven Bereich enthält.

25

4. Phagemid nach einem der Ansprüche 1 - 3, dadurch gekennzeichnet, daß es die Struktur von Fig. 1 hat.

5. Verfahren zur Herstellung eines Phagemids nach Anspruch 1, bei dem eine für einen Antikörper codierende DNA mit einer für ein Coliphagen pIII-Protein in voller Länge codierende DNA fusioniert und das erhaltene DNA Molekül in ein übliches Phagemid inseriert werden, wobei hierfür übliche DNA Rekombinationstechniken angewandt werden.

30

6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß eine für einen Einzelketten-Antikörper codierende DNA verwendet wird.

35

7. Verfahren nach Anspruch 5 oder 6, dadurch gekennzeichnet, daß zwischen den für den Antikörper und das Coliphagen pIII-Protein codierenden DNA Sequenzen eine Protease-sensitive Sequenz eingefügt wird.

- 18 -

1

8. Verwendung des Phagemids nach einem der Ansprüche 1 - 4 zur Selektion auf spezifische Antikörper aus Antikörper-Genbanken.

5

9. Verwendung des Phagemids nach einem der Ansprüche 1 - 4 zur Präsentation anderer Proteine oder Peptide auf der Oberfläche von Phagemid-Partikeln durch Austausch der den Antikörper codierenden DNA durch jene des gewünschten Proteins bzw. Peptids.

10

15

20

25

30

35

1/3

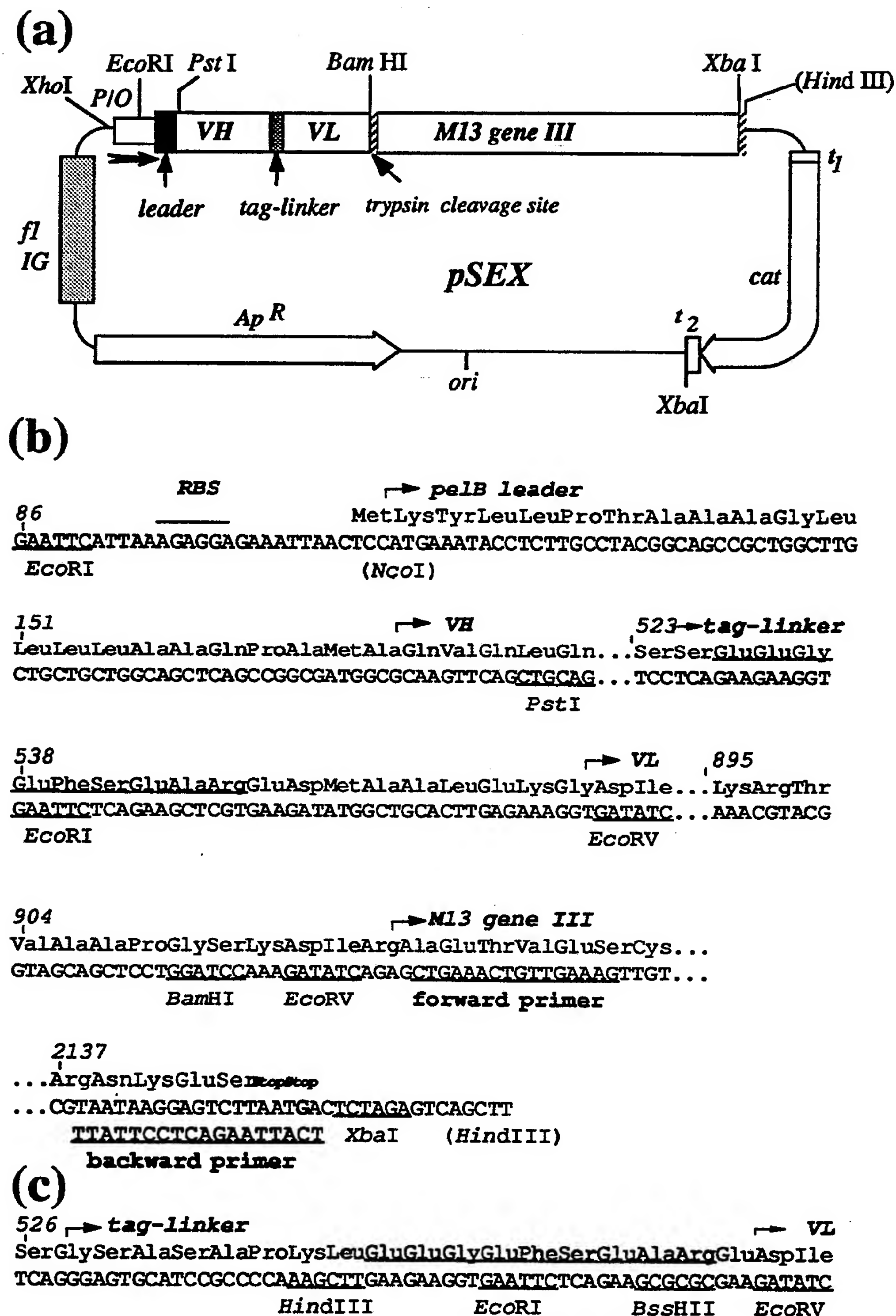


Fig.1

ERSATZBLATT

2/3

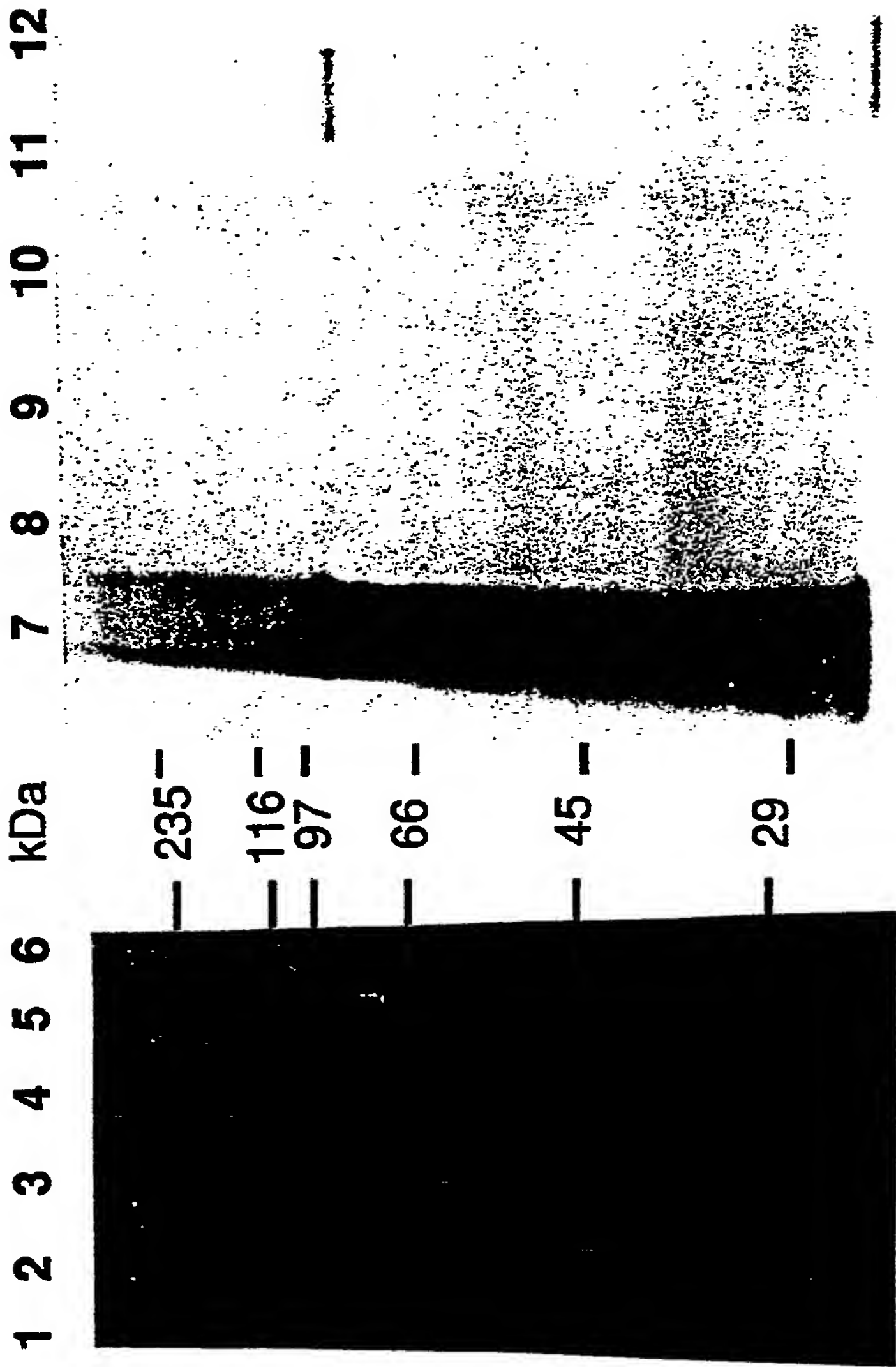


Fig. 2

3/3

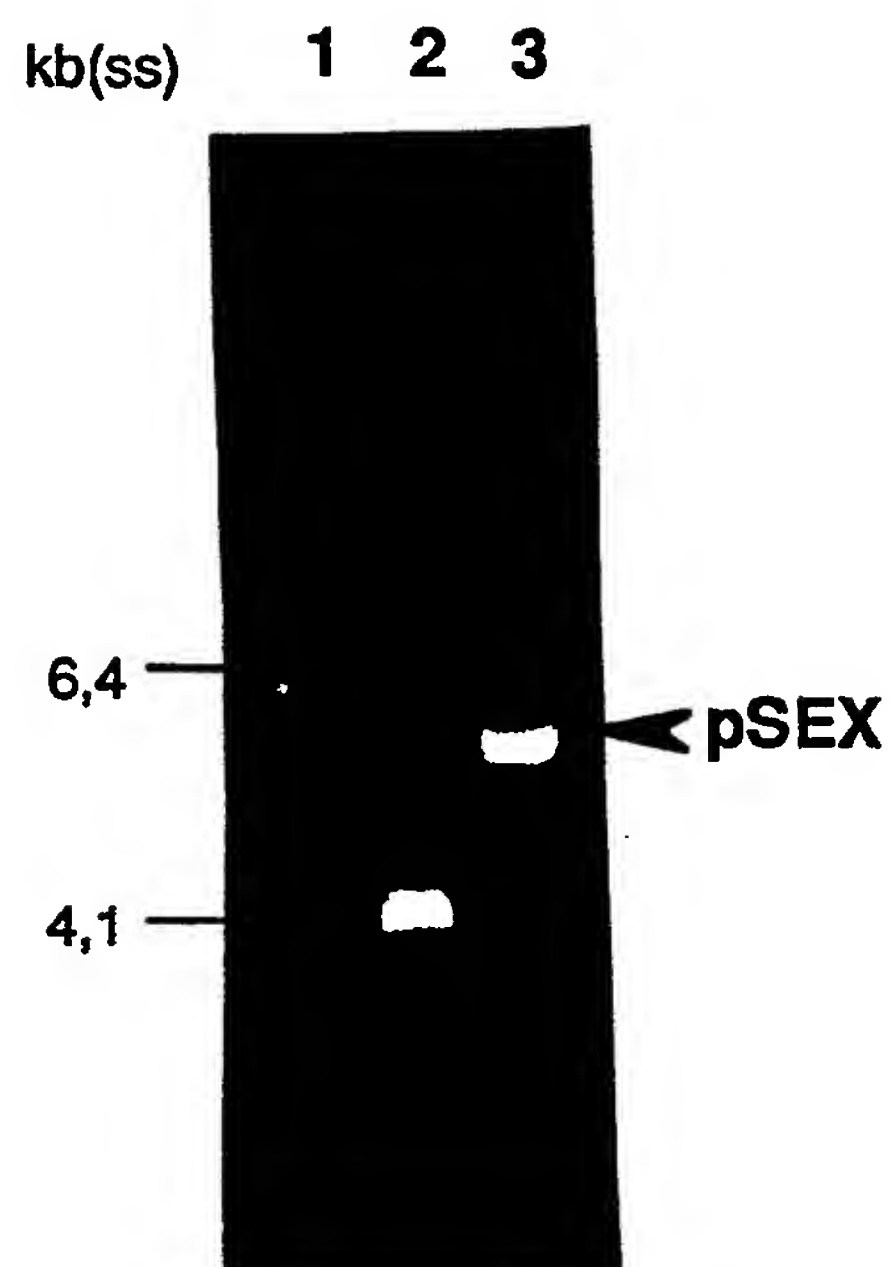


Fig. 3

ERSATZBLATT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 92/01524

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl. 5: C12N 15/13; C12P 21/08; C12Q 1/68; C07K 15/28; G01N 33/53

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl. 5: C12N; C07K; G01N; C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NATURE Vol. 348, 6 December 1990, MACMILLAN JOURNALS LTD., LONDON, UK; pages 552 - 554 J. MCCAFFERTY ET AL. 'Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains' (cited in the application)	1,2,5,6, 8,9
Y	see page 552, right column, line 1 - page 554, right column, line 30; figure 1 ----- -/--	1,3,5,7

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 SEPTEMBER 1992 (24.09.92)

Date of mailing of the international search report

12 OCTOBER 1992 (12.10.92)

Name and mailing address of the ISA/

EUROPEAN PATENT OFFICE

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 92/01524

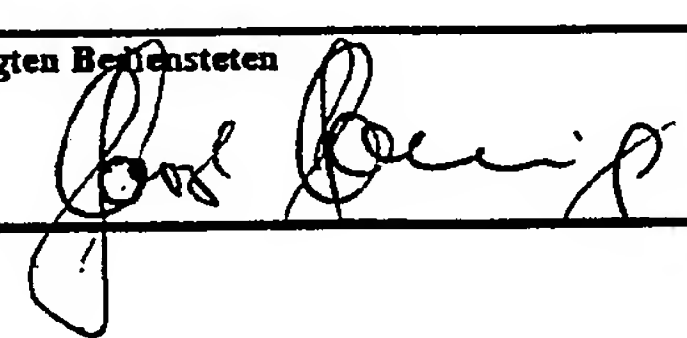
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>NATURE Vol. 341, 12 October 1989, MACMILLAN JOURNALS LTD., LONDON, UK; pages 544 - 546 E.S. WARD ET AL. 'Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from Escherichia coli' (cited in the application) see page 545, left column, line 23 - line 24; figure 2</p>	1,3,5,7
X	<p>-----</p> <p>PROC. NATL. ACAD SCI. Vol. 87, 1990, NATL. ACAD SCI., WASHINGTON, DC, US; pages 6378 - 6382 S.E. CWIRLA ET AL. 'Peptides on phage: a vast library of peptides for identifying ligands' (cited in the application) see page 6378, right column, line 1 - page 6380, right column, line 13; figure 1</p>	1,9
X	<p>-----</p> <p>SCIENCE Vol. 249, 27 July 1990, AAAS, WASHINGTON, DC, US; pages 386 - 390 J.K. SCOTT AND G.P. SMITH 'Searching for peptide ligands with an epitope library' (cited in the application) see page 389, right column, line 3 - line 33; figure 1</p>	1,9
P,X	<p>-----</p> <p>GENE Vol. 104, No. 2, 15 August 1991, ELSEVIER PUBLISHERS, N.Y., US; pages 147 - 153 F. BREITLING ET AL. 'A surface expression vector for antibody screening' see page 149, right column, line 8 - page 152, left column, line 13; figures 1-4</p>	1,9
P,X	<p>-----</p> <p>WO, A, 9 209 690 (GENENTECH, INC.) 11 June 1992 see claims 1-52; figure 1</p> <p>-----</p>	1,9

EP 9201524
SA 61471

The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information. 24/09/92

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9209690	11-06-92	None	

I. KLASSIFIKATION DES ANMELDUNGSGEGENSTANDS (bei mehreren Klassifikationssymbolen sind alle anzugeben) ⁶		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC		
Int.Kl. 5 C12N15/13; C12P21/08; C12Q1/68; C07K15/28 G01N33/53		
II. RECHERCHIERTE SACHGEBIETE		
Recherchierter Mindestprüfstoff ⁷		
Klassifikationssystem	Klassifikationssymbole	
Int.Kl. 5	C12N ; C07K ; G01N ; C12P	
Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen ⁸		
III. EINSCHLAGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN ⁹		
Art. ^o	Kennzeichnung der Veröffentlichung ¹¹ , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile ¹²	Betr. Anspruch Nr. ¹³
X	NATURE Bd. 348, 6. Dezember 1990, MACMILLAN JOURNALS LTD., LONDON, UK; Seiten 552 - 554 J. MCCAFFERTY ET AL. 'Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains' in der Anmeldung erwähnt	1,2,5,6, 8,9
Y	siehe Seite 552, rechte Spalte, Zeile 1 - Seite 554, rechte Spalte, Zeile 30; Abbildung 1 --- -/--	1,3,5,7
<p>^o Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen ¹⁰ :</p> <p>"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</p> <p>"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p>"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist</p> <p>"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p>		
IV. BESCHEINIGUNG		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche		Absenddatum des internationalen Recherchenberichts
24. SEPTEMBER 1992		12. 10. 92
Internationale Recherchenbehörde		Unterschrift des bevollmächtigten Beauftragten
EUROPAISCHES PATENTAMT		HORNIG H. 

III. EINSCHLAGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN (Fortsetzung von Blatt 2)		
Art °	Kennzeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	<p>NATURE Bd. 341, 12. Oktober 1989, MACMILLAN JOURNALS LTD., LONDON, UK; Seiten 544 - 546 E.S. WARD ET AL. 'Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from Escherichia coli' in der Anmeldung erwähnt siehe Seite 545, linke Spalte, Zeile 23 - Zeile 24; Abbildung 2 ---</p>	1,3,5,7
X	<p>PROC. NATL. ACAD. SCI. Bd. 87, 1990, NATL. ACAD. SCI., WASHINGTON, DC, US; Seiten 6378 - 6382 S.E. CWIRLA ET AL. 'Peptides on phage: a vast library of peptides for identifying ligands' in der Anmeldung erwähnt siehe Seite 6378, rechte Spalte, Zeile 1 - Seite 6380, rechte Spalte, Zeile 13; Abbildung 1 ---</p>	1,9
X	<p>SCIENCE, Bd. 249, 27. Juli 1990, AAAS, WASHINGTON, DC, US; Seiten 386 - 390 J.K. SCOTT AND G.P. SMITH 'Searching for peptide ligands with an epitope library' in der Anmeldung erwähnt siehe Seite 389, rechte Spalte, Zeile 3 - Zeile 33; Abbildung 1 ---</p>	1,9
P,X	<p>GENE Bd. 104, Nr. 2, 15. August 1991, ELSEVIER PUBLISHERS, N.Y., U.S.; Seiten 147 - 153 F. BREITLING ET AL. 'A surface expression vector for antibody screening' siehe Seite 149, rechte Spalte, Zeile 8 - Seite 152, linke Spalte, Zeile 13; Abbildungen 1-4 ---</p>	1-9
P,X	<p>WO,A,9 209 690 (GENENTECH, INC.) 11. Juni 1992 siehe Ansprüche 1-52; Abbildung 1 -----</p>	1,9

EP 9201524
SA 61471

Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

24/09/92

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO-A-9209690	11-06-92	Keine	
